Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 691-700

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۰، ص.۷۰۰-۶۹۱

مقاله پژوهشی

شناسایی ترکیبات شیمیایی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) بر قارچ‌های مولد فساد میوه سیب

مصطفی رحمتی جنیدآباد*[۱]- بهروز علیزاده بهبهانی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۰

چکیده

سمیت قارچ‌کش‌های سنتزی و مقاومت پاتوژن‌های قارچی به این عوامل نگهدارنده سبب افزایش تقاضا برای جایگزین‌های طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی شده است. در این پژوهش، اسانس آویشن دنایی با کمک روش تقطیر با آب استخراج گردید و ترکیبات تشکیل‌دهنده آن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی شناسایی و تعیین مقدار شدند. اسانس آویشن دنایی غنی از تیمول (۶۹/۸۸ درصد)، گاما-ترپینن (۸/۴۹ درصد)، پارا-سیمن (۸/۲۰ درصد) و کارواکرول (۳/۵۵ درصد) بود. علاوه بر این، محتوای فنول و فلاوونوئید کل اسانس به‌ترتیب ۹۱/۴۵ mg GAE/g و ۴۶/۲۸ mg QE/g به‌دست آمد که نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن ایفا کردند؛ به‌طوریکه فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH (IC_{50} معادل ۲۹/۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، رادیکال آزاد ABTS (IC_{50} معادل ۲۲/۶۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، جلوگیری از زوال رنگ بتا-کاروتن (۶۲/۲۲ درصد) و احیاء کردن آهن فریک (۳۰/۱۰ µM QE/g) اسانس آویشن دنایی قابل‌توجه بود. فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی در برابر قارچ‌های مولد فساد میوه سیب (*پنی‌سیلیوم اکسپانسوم، بوتریتیس سینه‌را و آلترناریا آلترناتا*) بررسی گردید و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* حساس‌ترین گونه قارچی نسبت به اسانس بود و غلظت‌های کمتری از اسانس جهت جلوگیری از رشد یا از بین بردن این گونه مورد نیاز بود. مطابق نتایج، اسانس آویشن دنایی را می‌توان به‌عنوان عامل ضدقارچ طبیعی و جایگزین قارچ‌کش‌های شیمیایی جهت جلوگیری از رشد قارچ‌های پاتوژن روی سیب یا سایر محصولات غذایی و افزایش عمر انبارمانی آن‌ها استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آویشن دنایی، اسانس، ضدقارچ طبیعی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

میوه سیب رتبه اول تولید سالیانه (۳/۵ میلیون تن) را در بین محصولات باغی به‌خود اختصاص داده است. اما این میوه به شدت مستعد فساد قارچی توسط جنس‌های پنی‌سیلیوم، بوتریتیس و آلترناریا پس از برداشت می‌باشد (Nikkhah *et al*., 2018). در حال حاضر، استفاده از قارچ‌کش‌های سنتزی به‌عنوان سهل الوصول‌ترین روش مدیریت و کنترل بیماری‌های پس از برداشت سبزیجات و میوه‌ها، به‌ویژه سیب در نظر گرفته می‌شود. با این حال، افزایش نگرانی در مورد آلودگی محیط زیست و ایجاد مسمومیت در انسان و همچنین ظهور گونه‌های قارچی مقاوم به قارچ‌کش‌های سنتزی، تقاضا برای جستجوی روش‌های کم خطرتر را افزایش داده است (Gholamnezhad, 2017). در این راستا، استفاده از ترکیبات با منشأ طبیعی که فعالیت ضدقارچی بالقوه‌ای دارند (مانند اسانس‌های گیاهی)، می‌تواند راه‌حل مؤثری جهت کنترل و جلوگیری از بیماری‌های پس از برداشت سبزیجات و میوه‌ها باشد.

کشور ایران با داشتن شرایط اقلیمی خاص به‌عنوان یکی از غنی‌ترین منابع گیاهان دارویی در جهان شناخته می‌شود. آویشن یکی از جنس‌های مهم خانواده نعناعیان است که جهت درمان بی‌خوابی و افسردگی و تقویت اعصاب به‌کار می‌رود و خواص ضدانگلی، ضدباکتریایی و ضدقارچی آن به اثبات رسیده است (Karimipour Fard *et al*., 2011). این جنس دارای ۴ گونه انحصاری در ایران می‌باشد که آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) یکی از این گونه‌های انحصاری است. سرشاخه‌های گلدار و برگ‌های خشک آویشن دنایی به‌عنوان قسمت‌های درمانی این گیاه شناخته می‌شوند و اسانس آن

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: Rahmati@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v17i5.87595

حاوی ترکیباتی از قبیل تیمول[1]، کارواکرول[2]، گاما-ترپینن[3]، پارا-سیمن[4] و بتا-کاریوفیلن[5] می‌باشد (Dadashpour *et al*., 2011a).

فعالیت ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی تیمول و کارواکرول در مطالعات مختلف گزارش شده است (Aeschbach *et al*., 1994; Marchese *et al*., 2016; Gursul *et al*., 2019; Rúa *et al*., 2019). بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی در برابر قارچهای مولد فساد میوه سیب (*پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*، *بوتریتیس سینه‌را* و *آلترناریا آلترناتا*) در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. علاوه بر این، ترکیبات مؤثره اسانس آویشن دنایی توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی شناسایی شدند و محتوای فنول کل، فلاوونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس نیز بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل بتا-کاروتن، لینولئیک اسید، معرف فولین-سیوکالتو، رادیکال آزاد ABTS، رادیکال آزاد DPPH، کلروفرم و توئین ۴۰ از شرکت سیگما (آمریکا) و محیط‌های کشت سابروز دکستروز آگار و سابروز دکستروز براث از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند.

سویه‌های میکروبی *آلترناریا آلترناتا*[6] (PTCC 5224)، *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*[7] (ATCC 48914) و *بوتریتیس سینه‌را*[8] (ATCC 28387) از آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند.

استخراج اسانس گیاه آویشن دنایی

پس از تأیید نام علمی گیاه (*Thymus daenensis*) عمل اسانس‌گیری با روش تقطیر با آب انجام گردید. بدین ترتیب که ۵۰ گرم از گیاه پودر و الک شده به ۷۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دستگاه کلونجر اضافه گردید. استخراج اسانس با سرعت تقطیر ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به مدت ۳ ساعت طول کشید. سپس اسانس حاصل در ظروف تیره رنگ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت انجام آزمون‌های ضدمیکروبی و شیمیایی نگهداری شد (Zandi-Sohani *et al*., 2013). بازده اسانس گیاه بر اساس وزن اسانس به‌دست آمده تقسیم بر وزن خشک گیاه و به صورت درصد وزنی/ وزنی محاسبه گردید.

کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی

از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (Agilent Technologies 5975C، امریکا) جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی گیاه آویشن دنایی استفاده شد. بدین منظور ۰/۲ میکرولیتر از اسانس استخراج شده به ستون دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد. دمای ستون از ۴۰ درجه سانتی‌گراد به ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. از گاز هلیوم با سرعت ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و انرژی یونش ۷۰ الکترون ولت استفاده گردید (Behbahani *et al*., 2017).

اندازه‌گیری میزان فنول کل

تعیین مقدار فنول کل اسانس گیاه با استفاده از روش Lee و همکاران (۲۰۱۲) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری گردید. ۵۰ میکرولیتر اسانس با ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فنول فولین-سیوکالتو (۱۰ درصد) به همراه ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد به محلول اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در مکان تاریک و در دمای اتاق نگهداری شد. جذب محلول در طول‌موج ۷۳۵ نانومتر اندازه‌گیری و مقدار فنول کل اسانس برحسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم اسانس (mg GAE/g) گزارش گردید.

اندازه‌گیری محتوای فلاوونوئید کل

محتوای فلاوونوئید کل اسانس گیاه آویشن دنایی با استفاده از روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید بر اساس روش Hossain و همکاران (۲۰۱۱) با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از اسانس گیاه با ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات ۱ مولار و ۴/۳ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و در دمای اتاق به مدت ۳ دقیقه نگهداری شد. جذب محلول در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. از کوئرستین جهت تهیه منحنی استاندارد استفاده شد و مقدار فلاوونوئید کل برحسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم اسانس (mg QE/g) گزارش گردید.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه آویشن دنایی به چهار روش مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال آزاد ABTS، روش رنگبری بتا-کاروتن/ لینولئیک اسید و روش FRAP اندازه‌گیری گردید.

1 Thymol
2 Carvacrol
3 γ-terpinen
4 p-Cymene
5 β-Caryophyllene
6 *Alternaria alternata*
7 *Penicillium expansum*
8 *Botrytis cinerea*

مهار رادیکال آزاد DPPH

جهت انجام این آزمون ۵۰ میکرولیتر از اسانس با ۵ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH ترکیب و پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق جذب نمونه در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس فرمول زیر محاسبه و گزارش گردید (Kizil *et al*., 2010).

(۱) فعالیت مهارکنندگی (درصد) = $(A_{\text{شاهد}} - A_{\text{نمونه}} / A_{\text{شاهد}}) \times ۱۰۰$

فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS

از روش Shan و همکاران (۲۰۰۵) با کمی تغییر جهت اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS استفاده گردید. در نتیجه واکنش مقادیر یکسان ABTS (۰/۷ میلی مولار) و پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی مولار) و نگهداری مخلوط به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی محلول کاتیون $ABTS^*$ حاصل گردید. سپس محلول $ABTS^*$ با استفاده از متانول تا رسیدن به جذب ۰/۷ در طول‌موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. در ادامه، ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده $ABTS^*$ با ۰/۱ میلی‌لیتر اسانس یا ۰/۱ میلی‌لیتر متانول (به عنوان نمونه کنترل) مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و جذب آن در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

(۲) فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS (درصد) = $[(A_{\text{کنترل}} - A_{\text{نمونه}}) / A_{\text{کنترل}}] \times ۱۰۰$

روش رنگبری بتا-کاروتن/لینولئیک اسید

ابتدا ۲۰ میکرولیتر بتاکاروتن (۲۰ mg/ml در کلروفرم) به ۴۰ میکرولیتر لینولئیک اسید و ۴۰۰ میلی‌گرم توئین ۴۰ و یک میلی‌لیتر کلروفرم اضافه گردید. کلروفرم به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر و بلافاصله ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و رقیق گردید. آب مقطر به مخلوط اضافه و هم‌زده شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از این محلول به ۳۵۰ میکرولیتر از اسانس اضافه شد و در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت حرارت داده شد. جذب محلول هر ۳۰ دقیقه در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. از نمونه فاقد بتاکاروتن به‌عنوان شاهد استفاده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت درصد بازداری اکسایش بتاکاروتن و طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Lee *et al*., 2012):

(۳) درصد بازداری (درصد) = $[(A_{\text{شاهد}} - A_{\text{نمونه}}) / A_{\text{شاهد}}] \times ۱۰۰$

قدرت احیاء کنندگی آهن فریک[1] (FRAP)

در این روش، ۵۰ میکرولیتر از اسانس با ۱/۵ میلی‌لیتر معرف FRAP مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جذب نمونه در طول‌موج ۵۹۴ نانومتر اندازه‌گیری گردید. از آهن Fe (II) جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد (Nanasombat *et al*., 2011).

آزمون‌های ضدمیکروبی

از ۴ آزمون دیسک دیفیوژن آگار[2]، انتشار چاهک در آگار[3]، حداقل غلظت مهارکنندگی[4] و حداقل غلظت کشندگی[5] جهت تعیین خاصیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی استفاده شد.

دیسک دیفیوژن آگار

بدین منظور، ابتدا اسانس گیاه آویشن دنایی توسط فیلتر غشایی با قطر ۰/۲۲ میکرونی استریل گردید. پلیت‌های حاوی سابروز دکستروز آگار استریل ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از قارچ‌های مورد بررسی روی آن کشت گردید. میزان ۲۰ میکرولیتر به دیسک‌های قرار گرفته بر سطح محیط کشت به آرامی اضافه شد و در نهایت پتری دیش‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از پایان زمان گرمخانه‌گذاری قطر هاله‌های عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) به‌عنوان مناطق مهارکننده گزارش گردید (Noshad *et al*., 2018).

انتشار چاهک در آگار

در این روش چاهک‌هایی در پلیت‌های حاوی سابروز دکستروز آگار و قارچ‌های مورد بررسی ایجاد شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از اسانس استریل به چاهک‌ها اضافه گردید. پس از آن پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (Behbahani *et al*., 2019).

حداقل غلظت مهارکنندگی

از روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۸) با اندکی تغییرات جهت اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس گیاه آویشن دنایی استفاده شد. پس از استریل اسانس با استفاده از فیلترهای ۰/۴۵ میکرونی، ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به لوله‌های آزمایش حاوی ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی اضافه گردید. پس از گرمخانه‌گذاری لوله‌ها در

1 Ferric reducing antioxidant power
2 Disk diffusion agar (DDA)
3 Well diffusion agar (WDA)
4 Minimum inhibitory concentration (MIC)
5 Minimum fungicidal concentration (MFC)

دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت رشد توسط کدورتی که ایجاد شده بود با چشم مشاهده گردید.

حداقل غلظت کشندگی

در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورتی مشاهده نگردید، بر سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت سابروز دکستروز آگار کشت داده شد. پس از پایان گرمخانه‌گذاری (۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد) حداقل غلظتی که در آن هیچگونه رشدی مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش گردید (Yeganegi *et al.*, 2018).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمایشات در ۳ تکرار انجام شدند و نتایج به‌صورت "انحراف معیار± میانگین گزارش شده‌اند. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش با کمک نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند و مقایسه میانگین نتایج توسط آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد (*P*<۰/۰۵) بررسی گردید.

نتایج و بحث

بازده و ترکیب شیمیایی اسانس

میانگین بازده استخراج اسانس از برگ‌ها و سرشاخه‌های جوان آویشن دنایی ۱/۲۶ درصد وزنی/ وزنی بود. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، عمده‌ترین ترکیبات اسانس آویشن دنایی شامل تیمول (۶۹/۸۸ درصد)، گاما-ترپینن (۸/۴۹ درصد)، پارا-سیمن (۸/۲۰ درصد) و کارواکرول (۳/۵۵ درصد) بودند. از سایر ترکیبات شناسایی شده در اسانس می‌توان به بتا-کاریوفیلن، آلفا-ترپینن، آلفا-پینن، لینالول، بورنئول، اوکالیپتول و کارواکرول متیل اتر اشاره نمود.

با مقایسه نتایج این مطالعه با یافته‌های سایر محققین، تفاوت‌هایی در نوع و غلظت ترکیبات اسانس آویشن دنایی مشاهده می‌شود. نعمتی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند که بازده اسانس آویشن دنایی ۱/۳۰ درصد و ترکیبات اصلی تشکیل دهنده آن به‌ترتیب تیمول (۶۷/۲ درصد)، گاما-ترپینن (۹/۹ درصد)، پارا-سیمن (۵/۵ درصد)، آلو-آرومادندرن[1] (۵/۵ درصد) و کارواکرول (۲/۵ درصد) بودند. در مطالعه Nikavar و همکاران (۲۰۰۵) مشخص گردید که بازده متوسط تولید اسانس آویشن دنایی ۲/۴ درصد است؛ عمده‌ترین ترکیبات سازنده اسانس شامل تیمول (۷۴/۷ درصد)، پارا-سیمن (۶/۵ درصد)، بتاکاریوفیلن (۳/۸ درصد) و متیل کارواکرول (۳/۶ درصد) بودند و ۷۹/۶ درصد از ترکیبات شناسایی شده در گروه فنول‌های مونوترپنی قرار گرفتند.

با مقایسه تأثیر مراحل مختلف برداشت بر ترکیبات موجود در اسانس اندام هوایی آویشن دنایی، صفایی و همکاران (۲۰۱۲) بیان نمودند که تیمول ترکیب غالب اسانس بوده و بیشترین مقدار آن (۸۵/۹ درصد) در مرحله ابتدای گلدهی مشاهده می‌شود؛ مقدار تیمول در مراحل ۵۰ درصد گلدهی، گلدهی کامل و بذردهی به‌ترتیب ۷۹/۷ درصد، ۸۲/۲ درصد و ۷۳/۶ درصد می‌باشد. محتوای تیمول ۵۱/۳-۷۸/۳ درصد، ۲/۷-۷/۶ درصد پارا-سیمن، ۲/۷-۱۰/۱ درصد گاما-ترپینن، ۲-۹/۲ درصد کارواکرول و ۲/۴-۴/۳ درصد بتا-کاریوفیلن در اسانس آویشن دنایی برداشت شده از مناطق مختلف استان اصفهان نیز در مطالعه برازنده و باقرزاده (۲۰۰۷) گزارش شده است. تفاوت در نوع و غلظت ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس ناشی از عوامل داخلی و خارجی مختلفی از قبیل ژنتیک، مرحله رشد، ارتفاع و طول و عرض جغرافیایی، دما، رطوبت، مقدار گیاه مورد نیاز جهت اسانس‌گیری و روش‌های مختلف اسانس‌گیری می‌باشد (Barzegar *et al.*, 2020).

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن دنایی با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی

شماره	ترکیبات تشکیل‌دهنده	درصد
۱	α-Thujene	۰/۶۳
۲	α-Pinene	۰/۵۱
۳	α-Terpinene	۱/۱۳
٤	p-Cymene	۸/۲۰
۵	Eucalyptol	۰/۵۵
٦	γ-Terpinen	۸/۴۹
۷	Terpinolene	۰/۶
۸	Linalool	۱
۹	Borneol	۰/۹۴
۱۰	Carvacrol methyl ether	۰/۸۷
۱۱	**Thymol**	۶۹/۸۸
۱۲	Carvacrol	۳/۵۵
۱۳	β- Caryophyllene	۲/۴۵
١٤	α-Humulene	۰/۱۹
۱۵	β- Bisabolene	۰/۴۰
کل		**۹۹/۳۹**

محتوای فنول و فلاوونوئید کل

اسانس آویشن دنایی غنی از ترکیبات فنولی (۹۱/۴۵ mg GAE/g) و فلاوونوئیدی (۴۶/۲۸ mg QE/g) بود (جدول ۲) که نقش بسزایی در خواص دارویی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی آن ایفا می‌کنند.

1 Allo-aromadendrene

محتوای فنول کل معادل ۶/۴۴ mg GAE/g (Dadashpour *et al*., 2011b)، ۱۰۸ mg GAE/g (Khoshsokhan *et al*., 2015) و ۱۴۰ mg GAE/g@ (Alavi *et al*., 2010) و محتوای فلاوونوئید کل معادل ۷۰/۵۶ mg QE/g (Tohidi *et al*., 2017) و ۴۸/۸ mg QE/g (Amiri, 2012) در اسانس آویشن دنایی گزارش شده است. مقدار بالای فنول کل اسانس آویشن دنایی به‌دلیل غلظت بالای تیمول آن است که به‌عنوان ترکیب فنولی مونوترپنی شناخته می‌شود (García *et al*., 2006). از دیگر ترکیبات فنولی آویشن دنایی می‌توان به اسیدهای فنولی از قبیل سیرینجیک، گالیک، وانیلیک، کافئیک،کلروژنیک، رومارینیک، سینامیک و ترانس-۲-هیدروسینامیک اسید اشاره داشت. علاوه بر این، گیاه آویشن دنایی حاوی مقادیر قابل‌توجهی ترکیبات فلاوونوئیدی مانند کوئرستین، آپیجنین، لوتئولین، نارینجنین و روتین می‌باشد (Bistgani and Sefidkon, 2019). اختلاف بین نتایج محتوای فنول و فلاوونوئید کل در این پژوهش در مقایسه با مطالعات سایر محققین به تفاوت‌های اکولوژیکی گیاه (ارتفاع، رطوبت، دما، طول و عرض جغرافیایی، اقلیم و خاک) و شرایط استخراج اسانس (دما، نوع حلال، زمان استخراج و نسبت حلال به ماده) نسبت داده می‌شود. ترکیبات فنولی (به‌ویژه تیمول) و فلاوونوئیدی نقش مهمی در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضدمیکروبی اسانس‌های زیست فعال ایفا می‌کنند (Noshad *et al*., 2020).

جدول ۲- محتوای فنول کل، فلاوونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن دنایی

فنول کل (mg GAE/g)	فلاوونوئید کل (mg QE/g)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی			
		مهار رادیکال DPPH (IC_{50}; µg/ml)	مهار رادیکال ABTS (IC_{50}; µg/ml)	بتا-کاروتن/لینولئیک اسید (درصد)	FRAP (µM QE/g)
۹۱/۴۵±۰/۳۷	۴۶/۲۸±۰/۴۳	۲۹/۳۰±۰/۶۰	۲۲/۶۸±۰/۴۴	۶۲/۲۲±۰/۸۰	۳۰/۱۰±۰/۳۸

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی "در شرایط برون تنی" جهت شبیه‌سازی واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء در سامانه‌های بیولوژیکی زنده طراحی شده‌اند و به‌طور گسترده‌ای برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های شیمیایی و بیولوژیکی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مطالعه حاضر، از ۴ روش آنتی‌اکسیدانی متداول فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال ABTS، رنگبری محلول بتا-کاروتن/ لینولئیک اسید و قدرت احیاء کنندگی آهن فریک (FRAP) جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن دنایی استفاده شد و نتایج در جدول ۲ گزارش شده‌اند.

آزمون فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بر پایه انتقال هیدروژن از ترکیب آنتی‌اکسیدان به رادیکال آزاد DPPH استوار است که در این حالت مولکول پایدار DPPH-H تشکیل شده و رنگ محلول از ارغوانی به زرد تغییر می‌یابد (Bai *et al*., 2017). در آزمون مهار رادیکال ABTS، رادیکال مونوکاتیونی ABTS ($ABTS^{•+}$) توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با قابلیت اهداء هیدروژن احیاء می‌شود که با کاهش جذب محلول در ۷۳۴ نانومتر همراه است (Pinto *et al*., 2005). آزمون رنگبری محلول بتا-کاروتن/ لینولئیک بر پایه افت رنگ زرد بتا-کاروتن در اثر واکنش با رادیکال‌های تشکیل شده از اکسیداسیون لینولئیک می‌باشد که سرعت افت رنگ بتا-کاروتن در حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد (Wang *et al*., 2010). در آزمون FRAP، قابلیت ماده آنتی‌اکسیدان در اهداء الکترون و متعاقباً احیای آهن فریک به نوع فروس ارزیابی می‌گردد (Firuzi *et al*., 2005).

مطابق نتایج، فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بر پایه IC_{50} اسانس آویشن دنایی به‌ترتیب ۲۹/۳۰ و ۲۲/۶۸ µg/ml بود. قابلیت اسانس در جلوگیری از افت رنگ محلول بتا-کاروتن/ لینولئیک اسید بالا بود، به‌طوریکه به میزان ۶۲/۲۲ درصد از زوال رنگ بتا-کاروتن جلوگیری نمود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن دنایی بر پایه روش FRAP نیز معادل ۳۰/۱۰ µM QE/g بود. درصد بازداری افت رنگ بتا-کاروتن معادل ۸۸/۴ درصد و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بر پایه IC_{50} معادل ۹۹/۶ µg/ml در اسانس آویشن دنایی در مطالعه امیری (۲۰۱۲) گزارش شده است. به‌علاوه، میزان IC_{50} (مهار رادیکال آزاد DPPH) برابر با ۲۰ µg/ml اسانس آویشن دنایی توسط Khoshsokhan و همکاران (۲۰۱۵) اندازه‌گیری شده است. در مطالعه علوی و همکاران (۲۰۱۰) مشخص گردید که اسانس آویشن دنایی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی در برابر رادیکال‌های آزاد DPPH (میزان IC_{50} برابر با ۰/۸ µg/ml) و جلوگیری از زوال رنگ بتا-کاروتن (درصد بازداری حدود ۹۵ درصد) می‌باشد. با مطالعه اثر مراحل گلدهی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن دنایی، علیزاده و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس حاصل از گیاه در مرحله گلدهی به‌طور معنی‌داری بالاتر از اسانس به‌دست آمده از گیاه قبل از مرحله گلدهی است که به محتوای فنول کل بالاتر آن نسبت داده شد؛ به‌طوریکه میزان IC_{50} (مهار رادیکال آزاد DPPH) و FRAP اسانس به‌ترتیب در محدوده ۸/۲۳-۸/۴۶ µg/ml و ۲۴/۲۳-۲۶/۴۵ µM QE/g بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن دنایی توسط Saidi و همکاران (۲۰۱۴) نیز بررسی شده است و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس بر پایه مهار رادیکال ABTS، مهار رادیکال آزاد

DPPH و FRAP را به ترتیب ۱/۵ mM Torolox/µl، ۷۰/۹ درصد و ۵/۵ mM Fe^{2+}/µl گزارش نمودند. تفاوت مشاهده شده بین نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این مطالعه و سایر مشاهدات محققین می‌تواند ناشی از غلظت اسانس مورد استفاده، غلظت ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی اسانس، مراحل مختلف رشد گیاه و سایر عوامل محیطی تأثیرگذار بر کمیت و کیفیت اسانس باشد.

ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی منابع طبیعی عمده‌ترین ترکیباتی می‌باشند که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و دهنده الکترون و هیدروژن عمل می‌کنند. تیمول و کارواکرول از ترکیبات فنولی اصلی گیاه آویشن دنایی به‌شمار می‌روند که نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه ایفا می‌کنند. با توجه به بومی بودن گیاه آویشن دنایی و دسترسی ارزان و آسان به این گیاه دارویی، می‌توان اسانس آن را استخراج و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی و جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در صنعت غذا و به‌منظور جلوگیری از تخریب اکسیداتیو مواد غذایی به‌کار برد.

فعالیت ضدقارچی

فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی در برابر قارچ‌های مولد فساد میوه سیب (*پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*، *بوتریتیس سینه‌را* و *آلترناریا آلترناتا*) در جدول‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. اسانس آویشن دنایی فعالیت ضدقارچی قابل‌توجهی نسبت به قارچ‌های مولد فساد نشان داد و اثر ضدقارچی آن وابسته به نوع گونه قارچی بود. در روش‌های ضدمیکروبی دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار، بالاترین و کمترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب برای قارچ‌های *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و *بوتریتیس سینه‌را* مشاهده شد. با مقایسه قطر هاله عدم رشد در این دو روش ضدمیکروبی مشخص گردید که قطر هاله عدم رشد در آزمون چاهک آگار بزرگتر از آزمون دیسک دیفیوژن آگار است؛ این حالت ناشی از این حقیقت است که اسانس آویشن دنایی در آزمون ضدمیکروبی چاهک آگار در تماس مستقیم با قارچ‌ها قرار دارد، اما سازوکار ضدمیکروبی اسانس در روش دیسک دیفیوژن آگار بر پایه انتشار اسانس از سطح دیسک‌های بلانک به محیط کشت استوار است که قطر هاله عدم رشد کوچکتری را سبب می‌شود (Behbahani *et al*., 2019). نتایج فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی به روش حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی نشان داد که غلظت کمتری از اسانس جهت جلوگیری از رشد یا از بین بردن *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* موردنیاز است. اگرچه حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس برای *بوتریتیس سینه‌را* بیشتر از *آلترناریا آلترناتا* بود، اما حداقل غلظت کشندگی برای این دو گونه قارچی برابر بود.

جدول ۳- ارزیابی فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی به روش دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار بر قارچ‌های مولد فساد میوه سیب

قارچ	دیسک دیفیوژن آگار (میلی‌متر)	چاهک آگار (میلی‌متر)
پنی‌سیلیوم اکسپانسوم	۱۴/۱۰±۰/۳۶^{bA}	۱۵/۹۰±۰/۲۸^{aA}
بوتریتیس سینه‌را	۱۰/۳۰±۰/۴۱^{aB}	۱۱/۰۰±۰/۵۴^{aC}
آلترناریا آلترناتا	۱۱/۹۰±۰/۳۰^{bB}	۱۳/۶۰±۰/۲۸^{aB}

حروف غیرمشابه کوچک در یک ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد است.
حروف غیرمشابه بزرگ در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح معنی‌داری ۵ درصد است.

جدول ٤- ارزیابی فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی به روش‌های حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر قارچ‌های مولد فساد میوه سیب

روش آزمون	*پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*	*بوتریتیس سینه‌را*	*آلترناریا آلترناتا*
حداقل غلظت مهارکنندگی (میکرودایلوشن براث)	۱۲/۵	۵۰	۲۵
حداقل غلظت مهارکنندگی (رقت آگار)	۱۲/۵	۱۰۰	۲۵
حداقل غلظت کشندگی	۵۰	۱۰۰	۱۰۰

به‌طور کلی، فعالیت بیولوژیکی اسانس گیاهی به ترکیبات فنولی آن (مانند تیمول و کارواکرول) نسبت داده می‌شود. فعالیت ضدمیکروبی این ترکیبات احتمالاً ناشی از حضور هسته آروماتیک و گروه OH فنولی واکنشگر در ساختار آن‌ها می‌باشد که قابلیت تشکیل پیوند هیدروژنی با گروه‌های SH– مکان فعال آنزیم‌های هدف را دارا بوده و از این طریق سبب غیرفعال شدن آنزیم‌های قارچی می‌شوند. علاوه بر این، اسانس گیاهی، به علت ماهیت آبگریز خود، جذب میسلیوم آبگریز شده و به این طریق از رشد میسلیوم قارچ جلوگیری می‌کند (Znini *et al*., 2013). لازم به ذکر است که ترکیبات متعددی در اسانس گیاهان دارویی حضور دارند و بنابراین چندین مکانیسم در فعالیت ضدقارچی آن‌ها نقش دارند؛ به‌طور مثال، به‌نظر می‌رسد که بعضی از ترکیبات اسانس سبب افزایش نفوذپذیری غشا و سپس تخریب غشای خارجی

قارچ می‌شوند، درحالیکه سایر ترکیبات منجر به کاهش اندازه قارچ و اصلاح مورفولوژی سلول آن می‌گردند (El Ouadi *et al*., 2017). در راستای نتایج این مطالعه، گزارش شده است که فعالیت ضدقارچی قابل‌توجه اسانس آویشن در برابر قارچ‌های پاتوژن *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*، *بوتریتیس سینه‌را* و *آلترناریا آلترناتا* ناشی از حضور ترکیبات مونوترپنی فنولی تیمول و کارواکرول در اسانس می‌باشد (Nikkhah *et al*., 2018). فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی (۴۷/۸۹–۹۰/۳۴ درصد بازداری) نسبت به قارچ‌های *آلترناریا سولانی*، *فوزاریوم سولانی* و *رایزوکتونیا سولانی* در مطالعه Alizadeh و همکاران (۲۰۱۳) گزارش شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس آویشن دنایی غنی از ترکیبات زیست فعال از قبیل تیمول (۶۹/۸۸ درصد) می‌باشد که نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی آن ایفا می‌کنند. بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن دنایی نشان داد که ترکیبات تشکیل‌دهنده آن قابلیت اهداء الکترون و هیدروژن را دارا بوده و از این طریق سبب مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند. علاوه بر این، اسانس آویشن دنایی عامل ضدقارچی مؤثری در برابر قارچ‌های مولد فساد میوه سیب (*پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*، *بوتریتیس سینه‌را* و *آلترناریا آلترناتا*) بود و بنابراین می‌توان این اسانس را به‌عنوان جایگزین قارچ‌کش‌های شیمیایی جهت جلوگیری از فساد قارچی سیب و سایر محصولات غذایی طی نگهداری به‌کار برد؛ به‌طوریکه اسانس‌های گیاهی سمیت کمتری داشته و زیست تجزیه‌پذیر می‌باشند. با این حال، ضروری است که فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن دنایی در برابر رشد قارچ‌های پاتوژن روی میوه سیب و قبل از معرفی آن بعنوان عامل قارچ‌کش مؤثر به بازار بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., & Aruoma, O. I. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, *32*(1), 31-36.

Alavi, L., Barzegar, M., Jabari, A., & NAGHDI, B. H. (2010). Effect of heat treatment on chemical composition and antioxidant property of *Thymus daenensis* essential oil. *Journal of Medicinal Plants*, *9*(35), 129-138.

Alizadeh Behbahani, B., & Imani Fooladi, A. A. (2018). Development of a novel edible coating made by Balangu seed mucilage and Feverfew essential oil and investigation of its effect on the shelf life of beef slices during refrigerated storage through intelligent modeling. *Journal of Food Safety*, *38*(3), e12443.

Alizadeh, A., Alizadeh, O., Amari, G., & Zare, M. (2013). Essential oil composition, total phenolic content, antioxidant activity and antifungal properties of Iranian *Thymus daenensis* subsp. daenensis Celak. as in influenced by ontogenetical variation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *16*(1), 59-70.

Amiri, H. (2012). Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2012*.

Bai, W., Wang, Q., Zeng, X., Fu, J., Liu, Y., & Dong, H. (2017). Antioxidant activities of chicken peptide-Maillard reaction products (CP-MRPS) derived from chicken peptides and d-glucose system. *Journal of Food Processing and Preservation*, *41*(2), e13041.

Barazandeh, M., & Bagherzadeh, K. (2007). Investigation on the Chemical Composition of the Essential of *Thymus daenensis* Celak from Four Different Regions of Isfahan Province. *Journal of Medicinal Plants*, *6*(23), 15-19.

Barzegar, H., Behbahani, B. A., & Mehrnia, M. A. (2020). Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. *Food Science and Biotechnology*, 29, 717-728.

Behbahani, B. A., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial Pathogenesis*, *136*, 103716.

Behbahani, B. A., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M. (2017). Use of *Plantago major* seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, *94*, 515-526.

Bistgani, Z. E., & Sefidkon, F. (2019). Review on ethnobotany, phytochemical, molecular and pharmacological activity of *Thymus daenensis* Celak. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *22*, 101400.

Dadashpour, M., Rasooli, I., Sefidkon, F., Rezaei, M. B., & Darvish Alipour Astaneh, S. (2011b). Lipid peroxidation inhibition, superoxide anion and nitric oxide radical scavenging properties of *Thymus daenensis* and *Anethum graveolens* essential oils. *Journal of Medicinal Plants*, *1*(37), 109-120.

Dadashpour, M., Rasooli, I., Sorouri Zanjani, R., Sefidkon, F., Taghizadeh, M., & Darvish Alipour Astaneh S. (2011a). Antimicrobial, nitric oxide radical scavenging and cytotoxic properties of *Thymus daenensis* essential oil. *Pathobiology Research*, *14*(1), 37-47.

El Ouadi, Y., Manssouri, M., Bouyanzer, A., Majidi, L., Bendaif, H., Elmsellem, H., & Hammouti, B. (2017). Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Microbial Pathogenesis*, *107*, 321-326.

Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1721*(1-3), 174-184.

García, D. A., Bujons, J., Vale, C., & Suñol, C. (2006). Allosteric positive interaction of thymol with the GABAA receptor in primary cultures of mouse cortical neurons. *Neuropharmacology*, *50*(1), 25-35.

Gholamnezhad, J. (2017). Effect of plant extracts against apple gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Journal of Applied Microbiology in Food Industry*, *3*(1), 53-66.

Gursul, S., Karabulut, I., & Durmaz, G. (2019). Antioxidant efficacy of thymol and carvacrol in microencapsulated walnut oil triacylglycerols. *Food Chemistry*, *278*, 805-810.

Hossain, M. A., Shah, M. D., Gnanaraj, C., & Iqbal, M. (2011). In vitro total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant Tetrastigma from Sabah. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *4*(9), 717-721.

Karimipour Fard, M., Mirzaei, A., Kargar, M., Khosravani, S. A. M., & Mohamadi, R. (2011). Antibacterial activities of *Thymus Denaensis,* Jaft and hydro-alcoholic extract of green hull *Pistacia atlantica* on *Listeria monocytogenes*. *Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal*, *17*(1), 68-77.

Khoshsokhan, F., Babalar, M., Poormeidani, A., & Fatahi, M. R. (2015). Antioxidant Activity, Total Phenolics and Oil Content of Some *Thymus kotschyanus* and *Thymus daenensis* Populations. *Plant Production Technology*, *7*(1), 153-162.

Kizil, S., Hasimi, N., Tolan, V., Kilinc, E., & Yuksel, U. (2010). Mineral content, essential oil components and biological activity of two mentha species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). *Turkish Journal of Field Crops*, *15*(2), 148-153.

Lee, W. C., Mahmud, R., Pillai, S., Perumal, S., & Ismail, S. (2012). Antioxidant activities of essential oil of Psidium guajava L. leaves. *APCBEE Procedia*, *2*, 86-91.

Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, *210*, 402-414.

Nanasombat, S., & Wimuttigosol, P. (2011). Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. *Food Science and Biotechnology*, *20*(1), 45-53.

Nemati, Sh., Sefidkon, F., & Poorherave, M. (2011). The effects of drying methods on essential oil content and composition of *Thymus daenensis* Celak. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, *27*(1), 72-80.

Nikavar, B., Mojab, F., & Dolat-Abadi, R. (2005) Composition of the volatile oil of Thymus daenensis Celak. subsp. daenensis. *Journal of Medicinal Plants*, *4*(13), 45-49.

Nikkhah, M., Habibi Najafi, M. B., Hashemi, M., & Farhoosh, R. (2018). Antifungal activity and synergistic effects of thyme, cinnamon, rosemary and marjoram essential oils in combination, against apple rot fungi. *Journal of Food Research*, *29*(1), 43-54.

Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Dehghani, S. (2020). Improving oxidative and microbial stability of beef by using a bioactive edible coating obtained from *Plantago lanceolata* seed mucilage and loaded with *Thymus vulgaris*. *Food Science and Technology*, *17*(101), 1-13

Noshad, M., Hojjati, M., & Behbahani, B. A. (2018). Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microbial Pathogenesis*, *116*, 153-157.

Pinto, P. C., Saraiva, M. L. M., Reis, S., & Lima, J. L. (2005). Automatic sequential determination of the hydrogen peroxide scavenging activity and evaluation of the antioxidant potential by the 2, 2′-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay in wines by sequential injection analysis. *Analytica chimica acta*, *531*(1), 25-32.

Rúa, J., del Valle, P., de Arriaga, D., Fernández-Álvarez, L., & García-Armesto, M. R. (2019). Combination of carvacrol and thymol: Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antioxidant activity. *Foodborne Pathogens and Disease*, *16*(9), 622-629.

Safaei, L., Sharifi Ashoorabadi, E., Zeinali, H., & Mirza, M. (2012). The effect of different harvesting stages on aerial parts yield, essential oil percentage and main components of *Thymus daenensis* Celak. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, *28*(2), 342-355.

Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7749-7759.

Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Arzani, A. (2017). Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of Thymus species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, *220*, 153-161.

Wang, J., Liu, H., Zhao, J., Gao, H., Zhou, L., Liu, Z., ... & Sui, P. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of the root bark essential oil of *Periploca sepium* and its main component 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. *Molecules*, *15*(8), 5807-5817.

Yeganegi, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Asili, J., Behbahani, B. A., & Beigbabaei, A. (2018). *Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial Pathogenesis*, *116*, 62-67.

Zandi-Sohani, N., Hojjati, M., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2013). Insecticidal and repellent activities of the essential oil of Callistemon citrinus (Myrtaceae) against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Neotropical Entomology*, *42*(1), 89-94.

Znini, M., Cristofari, G., Majidi, L., Paolini, J., Desjobert, J. M., & Costa, J. (2013). Essential oil composition and antifungal activity of *Pulicaria mauritanica* Coss., against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *LWT-Food Science and Technology*, *54*(2), 564-569.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 5, Dec- Jan 2021, p. 691-700

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۰، ص.۷۰۰-۶۹۱

Identification of chemical compounds, antioxidant potential, and antifungal activity of *Thymus daenensis* essential oil against spoilage fungi causing apple rot

M. Rahmati-Joneidabad[*1], B. Alizadeh Behbahani[2]

Received: 2020.07.03
Accepted: 2020.08.31

Introduction: Apple fruit is highly susceptible to fungal spoilage by Penicillium, Botrytis, and Alternaria species. Currently, the use of synthetic fungicides is considered to be the most accessible method of managing and controlling post-harvest diseases of vegetables and fruits, especially apples. However, increasing concern about environmental pollution, the toxicity, and the resistance of fungal pathogens to synthetic fungicides have resulted in an increased demand for less dangerous methods. In this regard, the use of compounds of natural origin that have potential antifungal activity (such as herbal essential oils), can be an effective solution to control and prevent post-harvest diseases of vegetables and fruits. In this study, the potential antifungal activity of *Thymus daenensis* essential oil was evaluated against fungi species causing apple rot (i.e., *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata*, and *Botrytis cinerea*). The chemical compounds, total phenol and flavonoids content, and antioxidant activity of the essential oil were also determined.

Materials and Methods: In this study, the essential oil of *T. daenensis* was extracted by the hydrodistillation method and its main chemical compounds were identified and quantified by gas chromatography coupled to mass spectrometry apparatus. Total phenols and flavonoids content of the essential oil were measured using the Folin-Ciocalteu and Aluminum chloride colorimetric methods, respectively. The *in-vitro* antioxidant activity of *T. daenensis* essential oil was evaluated based on the DPPH/ABTS free radical scavenging activity, beta-carotene bleaching, and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. The antifungal effect of the essential oil against *Penicillium expansum*, *Alternaria alternata*, and *Botrytis cinerea* was investigated by the disk diffusion agar (DDA), well diffusion agar (WDA), minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum fungicidal concentration (MFC).

Results and Discussion: The *T. daenensis* essential oil was rich in thymol (69.88%), γ-terpinen (8.49%), p-cymene (8.20%), and carvacrol (3.55%). In addition, the total phenol and flavonoids content of the essential oil were 91.45 mg GAE/g and 42.28 mg QE/g, respectively, which had an important role in its antioxidant activity. The *T. daenensis* essential oil had remarkable DPPH free radical scavenging activity (IC_{50}= 29.30 mg/ml), ABTS free radical scavenging activity (IC_{50} = 22.68 mg/ml), beta-carotene bleaching inhibitory effect (62.22%), and ferric reducing antioxidant power (30.10 μM QE/g), revealing the electron/hydrogen donating ability of the essential oil. Antifungal results showed that *P. expansum* was the most sensitive fungi species to the essential oil and lower concentrations of the essential oil were required to inhibit the growth of or kill the species, due to the presence of phenolic compounds (such as thymol and carvacrol) in the oil. Indeed, reactive aromatic nucleus and phenolic OH groups in the structure of phenolic compounds can form hydrogen bonds with –SH groups at the active sites of target enzymes, leading to the deactivation of the fungal enzymes. In addition, the lipophilic nature of the essential oils makes them to be highly absorbed by the lipophilic mycelia and consequently suppress the growth of fungi species. Based on the results, the *T. daenensis* essential oil could be used as a natural antifungal agent and synthetic fungicide substitute to prevent the growth of pathogenic fungi on apple fruit or other food products and increase their shelf-life.

Keywords: *Thymus daenensis*, Essential oil, Natural antifungal, Antioxidant activity.

1. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
(Corresponding Author Email: Rahmati@asnrukh.ac.ir)